

反すう家畜第一胃内纖毛虫Entodinium属の多糖類代謝と第一胃内消化におけるその意義に関する研究

著者	脇田 正彰
号	354
発行年	1988
URL	http://hdl.handle.net/10097/16961

氏 名(本籍) ^{わき}脇 ^た田 ^{まさ}正 ^{あき}彰

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 3 5 4 号

学位授与年月日 平 成 元 年 1 月 12 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 反すう家畜第一胃内纖毛虫 Entodinium
属の多糖類代謝と第一胃内消化における
その意義に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 堀口 雅昭

教授 勝野 正則

助教授 佐々木康之

論文内容要旨

反すう動物の消化生理には第一胃内に生息する様々の細菌および単細胞動物の機能が深く関与しており、繊維質や非タンパク態窒素などの利用が可能である反面、単胃動物では見られない飼料成分の損失や消化機能障害の危険性がある。これら多様な微生物の機能や生態を明らかにし、これに働きかけて第一胃内の発酵を制御することによって飼料の利用性、反すう動物の生産性を向上させることは、飼養技術の開発の上から重要な課題である。

Entodinium属繊毛虫は第一胃内で最多数を占める原生動物であるが、デンプン質に富む飼料を給与した反すう動物の第一胃内には高密度で存在し、その虫体内には多数のデンプン粒が取り込まれていることが古くから知られている。しかし、その詳細は明らかにされていない。第一胃内におけるデンプンの消化にはデンプン利用菌の機能も関与しており、また、発酵産物として乳酸が生成されることから、宿主家畜の消化生理との関連でEntodinium属繊毛虫の多糖類代謝に関心が持たれる。

本研究は、Entodinium属繊毛虫のデンプン粒取り込みと分解様相、糖代謝関連酵素の検索および酵素化学的性質の調査、第一胃内細菌や第一胃内発酵様相との関連を明らかにして、第一胃内消化に対するEntodinium属繊毛虫の多糖類代謝の意義について論究した。

1. 繊毛虫のデンプン粒の取り込みと分解について

In vitroでEntodinium属繊毛虫のコメデンプン粒の取り込みと分解過程の観察と測定を行った。Entodinium属繊毛虫のデンプン粒取り込みは極めて速く、デンプン粒添加15分後には繊毛虫10万個体当たり4.5mgが取り込まれた。体内デンプン粒は培養時間の経過に従ってその数が減少し、細胞外質にルゴール液で赤褐色に染色される微細な多糖類が蓄積され、それは虫体内に取り込まれたデンプン粒がほぼ消失したところから減少した (Fig. 1)。この多糖類は、走査電顕像で $0.5 \times 0.6 \mu\text{m}$ の楕円球状を呈しており、グルコースが $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合して連なり、さらに $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合で分岐した構造で平均鎖長が23~25のアミロペクチン様物質であることが明らかとなり、繊毛虫独自の貯蔵多糖類であると考えられた。

めん羊の第一胃フィステルから各種のデンプンを投与し、また、濃厚飼料の給与量を変えて、In vivoにおけるEntodinium属繊毛虫のデンプンの取り込みと分解の推移を検討した。その結果、Entodinium属繊毛虫の体内へのデンプン粒の取り込みと分解速度は、デンプン粒の大きさ、形状および量によって異なり、小さくて粒状のコメデンプン粒は極めて短時間に体内に取り込まれて比較的速く消失した。また、デンプン質飼料を給与すると第一胃内のEntodinium属繊毛虫数が著しく増加し、第一胃液中に含まれる繊毛虫体内多糖類量が多くなり、ガーゼろ過液1 ml当たり275mg以上になると試算された。また、Entodinium属繊毛虫は取り込んだデンプンの一部を独自の貯蔵多糖類に転換し、比較的緩和なデンプン分解をしているものと考えられた。

これらの結果から、Entodinium属繊毛虫は第一胃内における多糖類の代謝において重要な

役割を果たしているものと考えられた。

2. Entodinium属繊毛虫の糖代謝関連酵素の検索とそれらの酵素化学的性質

第一胃内繊毛虫の糖代謝関連酵素についての知見は極めて少ない。Entodinium属繊毛虫の無細胞液から、Phosphorylase, Glycogen synthase, Hexokinase, Phosphoglucomutase, Glucosephosphate isomerase, Hexosediphosphatase, Pyruvate kinase 活性が存在することを確認した (Fig.2)。主要な酵素について酵素化学的性質を調査した結果、次のような数々の新知見が得られた。Glycogen synthase には Glucose-6-phosphate 依存型と非依存型の二つのタイプが存在し、後者の活性割合は体内多糖類量と高い負の相関が認められた。Pyruvate kinase は DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーで三つの活性ピークに分けられ、酵素化学的性質から少なくとも二つ以上のアイソザイムが存在するものと考えられた。この内の一つの画分の活性は AMP および Fluctose 1, 6-bisphosphate (FDP) で活性化され、ATP で阻害された。また、Adenylate energy charge が低い時に高活性を示し、Adenylate energy charge が高くなるに従い活性が著しく低下することから、繊毛虫の糖代謝調節酵素の一つであることを考察した (Fig.3)。また、Phosphorylase, Glycogen synthase, Glucosephosphate isomerase および Pyruvate kinase の活性はそれぞれ体内多糖類量と高い相関が存在した。さらに、高等動物の糖代謝調節に重要な役割を果たしている Cyclic AMP とその合成酵素 (Adenyl cyclase) と分解酵素 ($3':5'$ -Cyclic-nucleotide nucleotidohydrolase) 活性が存在することを確認した。また、分岐鎖アミノ酸のアミノ基を転移して糖質および分岐鎖脂肪酸合成経路への反応を司る Branched chain amino acid aminotransferase の性質を明らかにし、その意義について考察した。

これらのことから、単細胞動物である Entodinium 属繊毛虫の糖代謝は高等動物と同様に複雑で高度な調節機構が存在するものと推測された。

3. Entodinium属繊毛虫とデンプン利用菌および第一胃内発酵様相との関係

粗飼料主体の飼料から濃厚飼料の割合を段階的に増給させた時のめん羊の Entodinium 属繊毛虫と pH, 揮発性脂肪酸 (VFA) 濃度, アンモニア態窒素濃度, 乳酸濃度, 細菌数および飼料摂取状態との関係を調査した。第一胃内 Entodinium 属繊毛虫は濃厚飼料割合が増加すると増加したが、同一飼料を給与している期間でも密度は変化して経日周期が存在する傾向にあった。飼料給与 3 時間後の第一胃液から多くの場合に高濃度の乳酸は検出されなかったが、乳酸が高濃度で検出されたのは Entodinium 属繊毛虫の密度が減少方向に傾いている時であり、高濃度の

乳酸が蓄積して第一胃液 pH が 5.0 以下となると繊毛虫が存在しなくなり、細菌、特にグラム染色性陽性の細菌が著しく増加した。また、総 VFA 濃度の低下、酢酸：プロピオン酸 (A/P) 比の上昇、アンモニア態窒素濃度の著しい低下が見られた。この様な状態に陥っためん羊は、採食時間を延ばしたり採食拒絶をすることによって第一胃内環境を回復させるが、規定量の飼料を摂取するようになると再び同様の状態に陥った (Fig.4)。乳酸が高濃度に蓄積しなかっためん羊の第一胃内には *Entodinium* 属繊毛虫が高密度で存在しており、pH の経日的変動が小さく、細菌数の著しい変化は見られなかった (Fig.5)。

濃厚飼料割合 60% の飼料を給与しためん羊では、明瞭な *Entodinium* 属繊毛虫密度の経日的周期が観察され、密度の高い時にはデンプン利用菌数が少なく (Fig.6)、両者の間には高い負の相関が認められた (Fig.7)。

粗飼料主体の飼料から濃厚飼料の割合を 1 日当たり 5 % ずつ漸増させてめん羊に給与すると、*Entodinium* 属繊毛虫、デンプン利用菌および乳酸利用菌が増加した。*Entodinium* 属繊毛虫密度は、濃厚飼料割合が 80% の飼料を給与したときに最高となった。セルロース利用菌は濃厚飼料割合が 70% 以上になると直線的に減少した。濃厚飼料の給与割合が 85% 以上となって第一胃液 pH が 5.7 以下になると、*Entodinium* 属繊毛虫は著しく減少し、逆にデンプン利用菌と乳酸利用菌が著しく増加した (Fig.8)。

デンプン利用菌がデンプン粒に付着し、*Entodinium* 属繊毛虫がそれを摂取することを明らかにし、*Entodinium* 属繊毛虫によるデンプン取り込みは、デンプン利用菌を特異的に取り込んでその増加を抑制する一つの要因であると考えられた。

これらの結果より、第一胃内におけるデンプン利用に関して *Entodinium* 属繊毛虫とデンプン利用菌とが競合関係にあり、通常は *Entodinium* 属繊毛虫が優先的に多くのデンプンを利用して増殖しているものと考えられた。第一胃液の急激な pH の低下は乳酸の蓄積によるものであり、反すう動物の正常な第一胃内消化のためには pH が 5.0 以下にならないことが重要であることが明らかとなった。*Entodinium* 属繊毛虫の多糖類代謝機能は、特に高濃厚飼料食餌に対する適応過程で乳酸利用菌による乳酸分解機能が十分確立されていない段階においてデンプン利用菌数の著しい増加を抑制することにより、急激かつ多量の乳酸生成を回避して第一胃内 pH の恒常性維持に貢献しているものと推論した。

以上、本研究は、*Entodinium* 属繊毛虫のデンプン消化過程、多糖類代謝関連酵素の諸性質およびデンプン利用菌との関係について多くの新知見を提供し、第一胃内における *Entodinium* 属繊毛虫の存在意義を多糖類代謝の一側面から明らかにした。

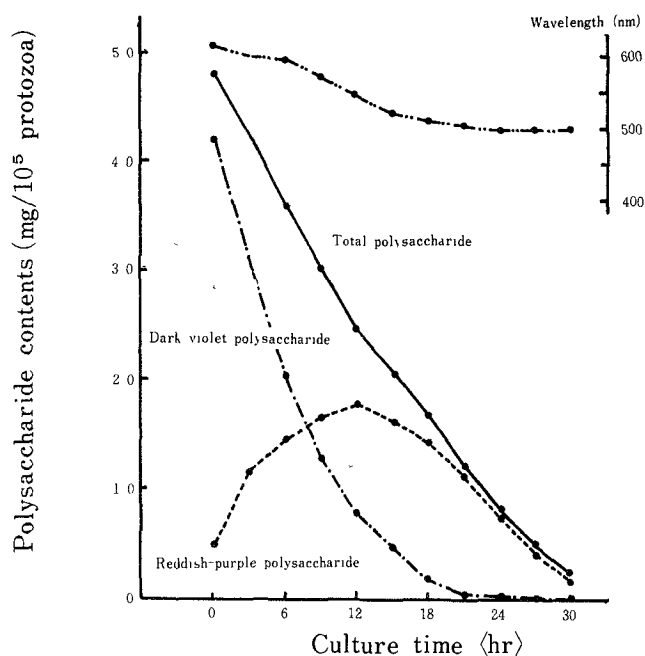


Fig.1. Changes of protozoal polysaccharide contents fractionated by Millipore filter (1.0 μ m) and the λ max of iodine-polysaccharide complex when protozoa was cultured in mineral salt solution after the accumulation of starch

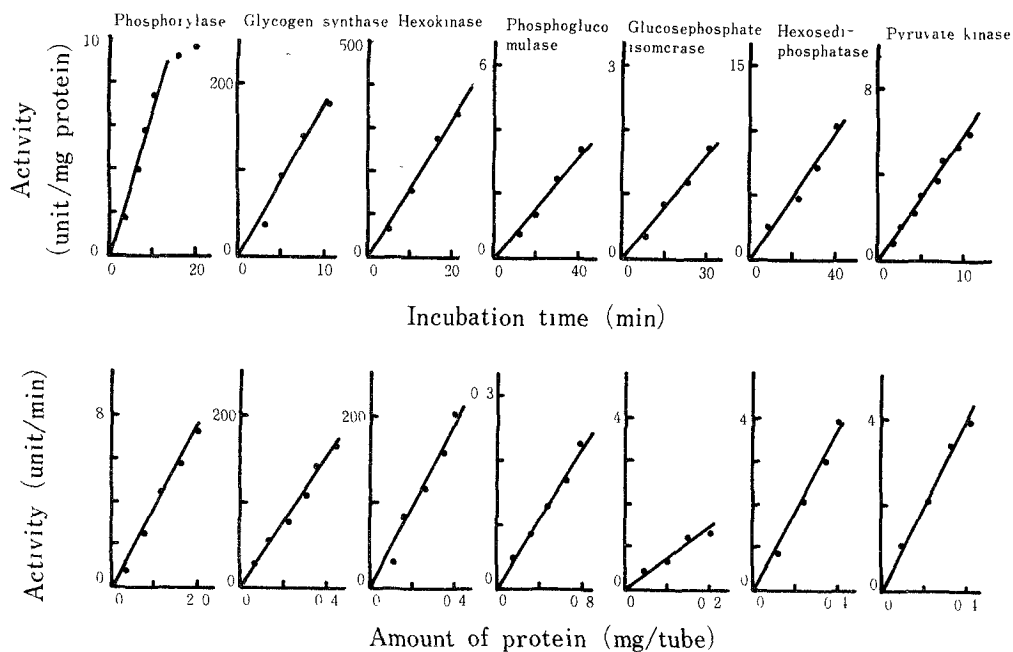


Fig.2. Glycolytic enzyme activities in the sonic lysates from ciliates.

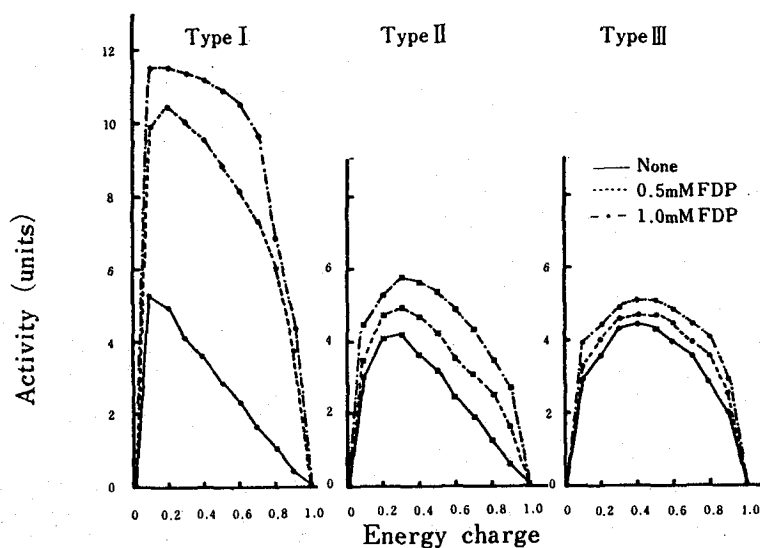


Fig.3. Effects of energy charge and FDP on three types of protozoal Pyruvate kinase.

Table 1. The classification of rumen microflora according gram stain, appearance and size

Bacterial group No.	Gram reaction	Shape	Size (μm)
1	—	cocci	0.3—1.0
	V ^a	cocci	1.0—1.7
	V	chained cocci	1.0—1.7
2	—	comma-shaped rods	0.75—1.1
	—	curved rods (small)	(0.2—0.4) \times (0.8—4.0)
	—	curved rods (medium)	(0.4—0.7) \times (1.7—4.5)
	—	curved rods (large)	(0.7—1.5) \times (2.6—7.0)
3	—	spirals (small)	(0.3—0.5) \times (2.0—3.0)
	—	spirals (medium)	(0.2—0.35) \times (3.0—8.0)
	—	spirals (large)	(0.3—0.5) \times (3.0—10.0)
4	—	rods (small)	(0.35—0.7) \times (0.9—2.0)
	—	rods (medium)	(0.7—0.9) \times (1.2—3.0)
	—	cocco-bacilli	(0.75—1.5) \times (1.5—2.5)
	—	tapered rods	(0.6—1.3) \times (1.0—2.7)
	—	tapered paired rods	(0.8—1.1) \times (1.1—1.8)
	—	slender rods	(0.2—0.3) \times (2.0—8.0)
	V	spore-forming rods	(0.6—1.2) \times (1.5—4.0)
5	—	rods (large)	(0.9—1.7) \times (1.8—4.5)
6	+	cocci	0.5—1.1
	+	chained cocci	0.5—1.1
7	+	rods (small)	(0.45—0.65) \times (0.65—1.2)
	+	rods (medium)	(0.45—0.76) \times (1.2—2.1)
8	+	chained rods	(0.3—0.7) \times (1.0—3.0)
		others	

^a Gram variable

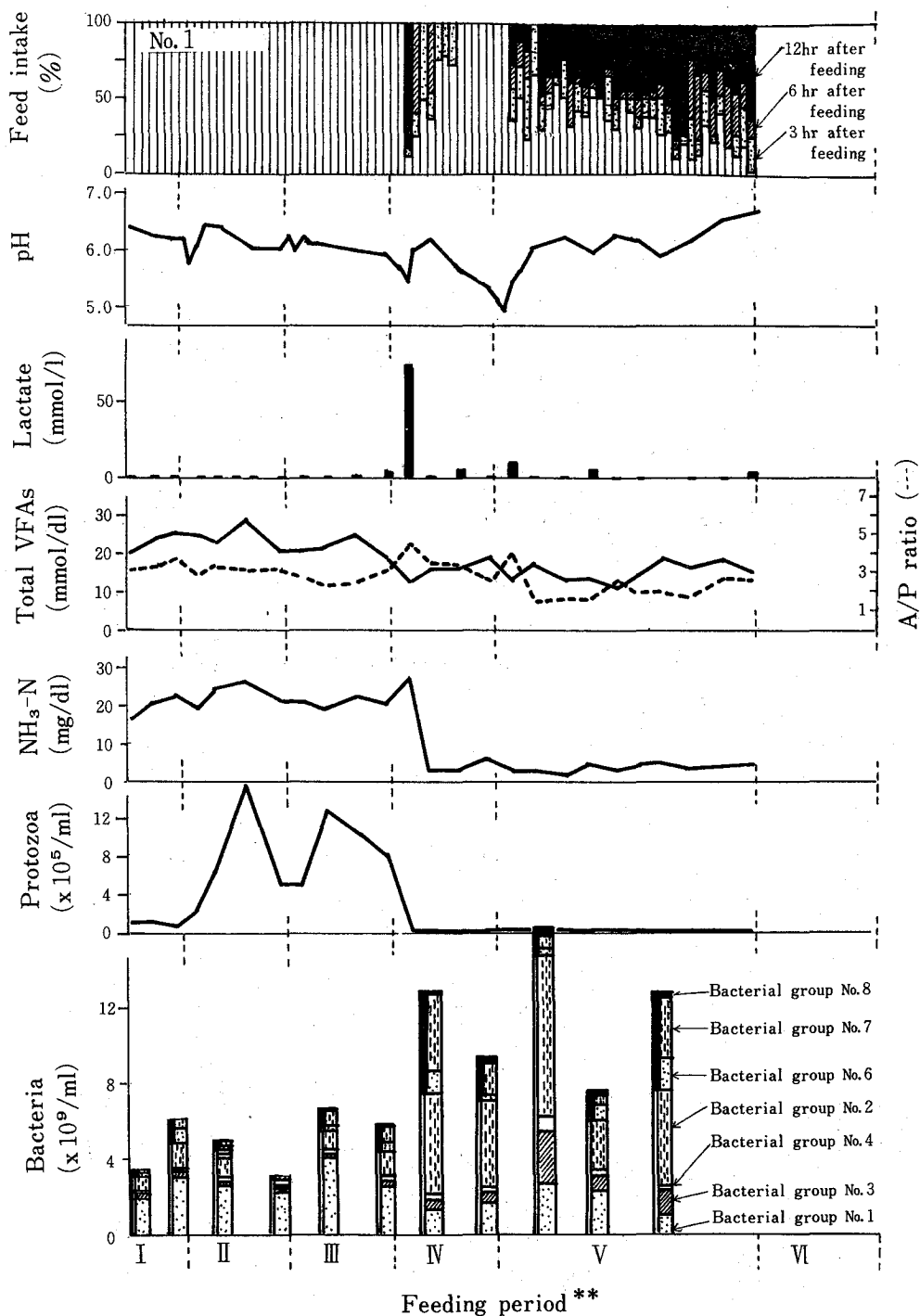


Fig.4. Changes in feed intake, ruminal pH, lactic acid, VFAs, ammonia-N and bacteria* of sheep No.1. *See table 1 for bacterial groups. ** I, II, III, IV, V and VI : Sheep were fed the 0, 25, 50, 75, 85 and 100% concentrate diat for 7, 14, 14, 14, 35 and 16days respectively.

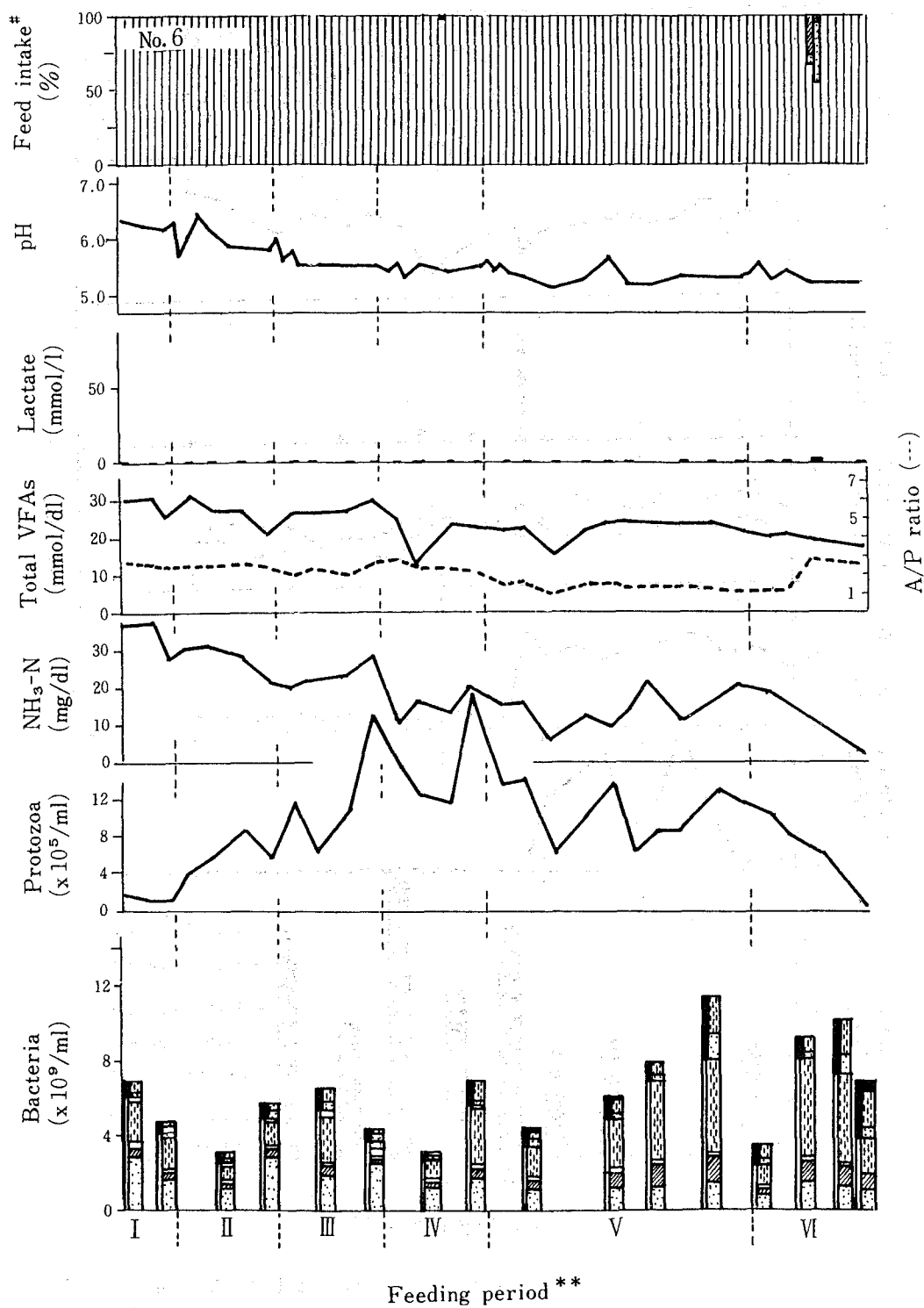


Fig.5. Changes in feed intake[#], ruminal pH, lactic acid, VFAs, ammonia-N and bacteria^{*} of sheep No.6. [#], ^{*}, ^{**}See Fig.4 and Table 1.

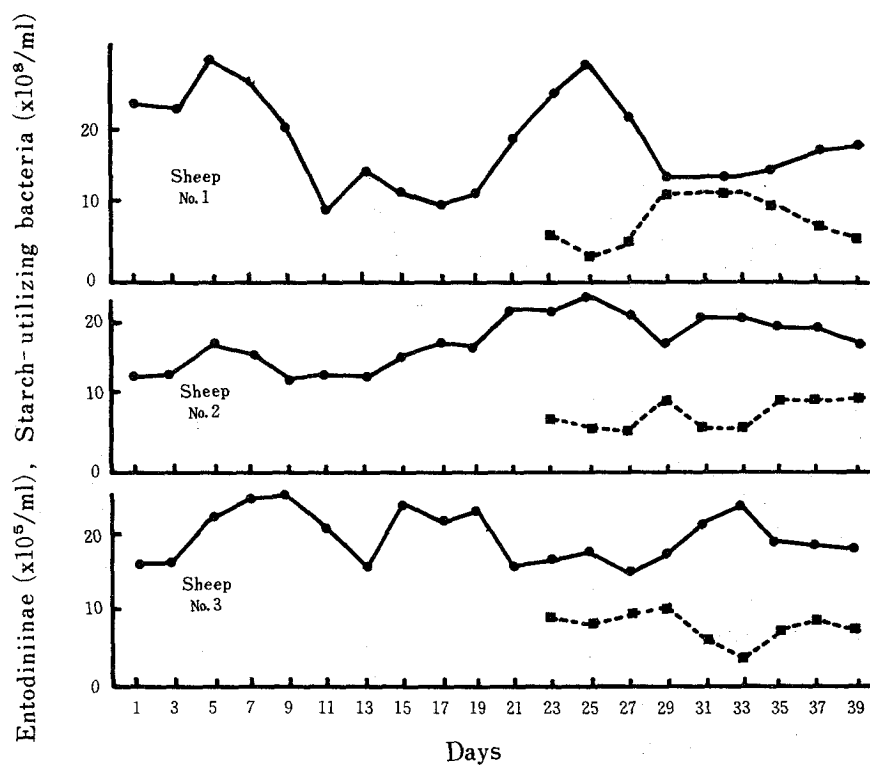


Fig.6. Changes of protozoa (—●—) and starch-utilizing bacteria counts (---■---) in the rumen liquor from sheep fed the 60% concentrate diet.

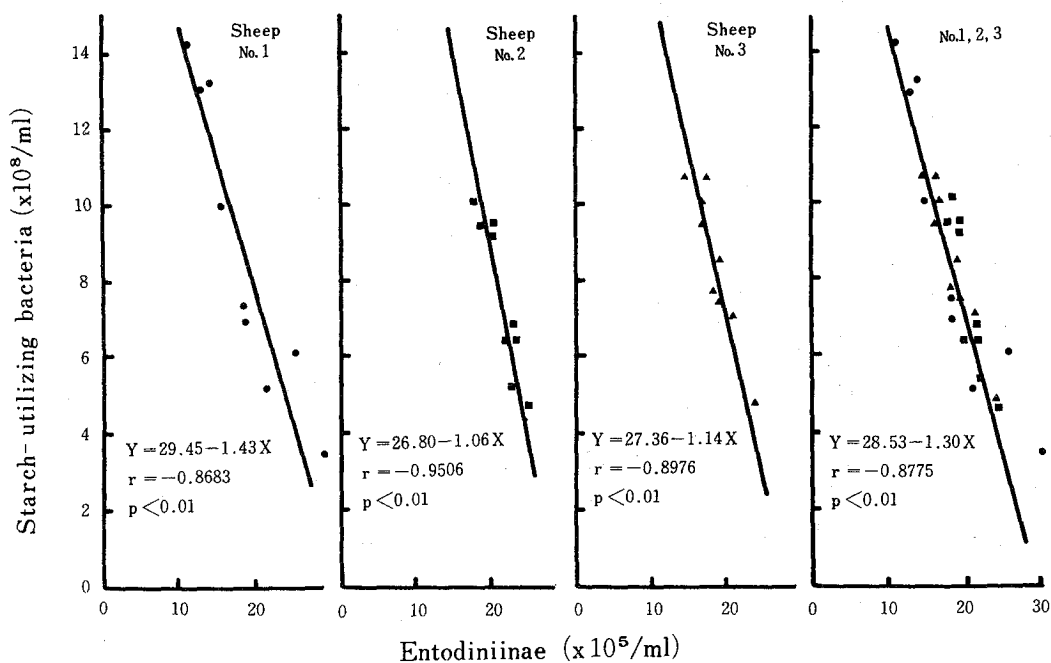


Fig.7. Correlation between protozoa numbers and starch-utilizing bacteria counts.

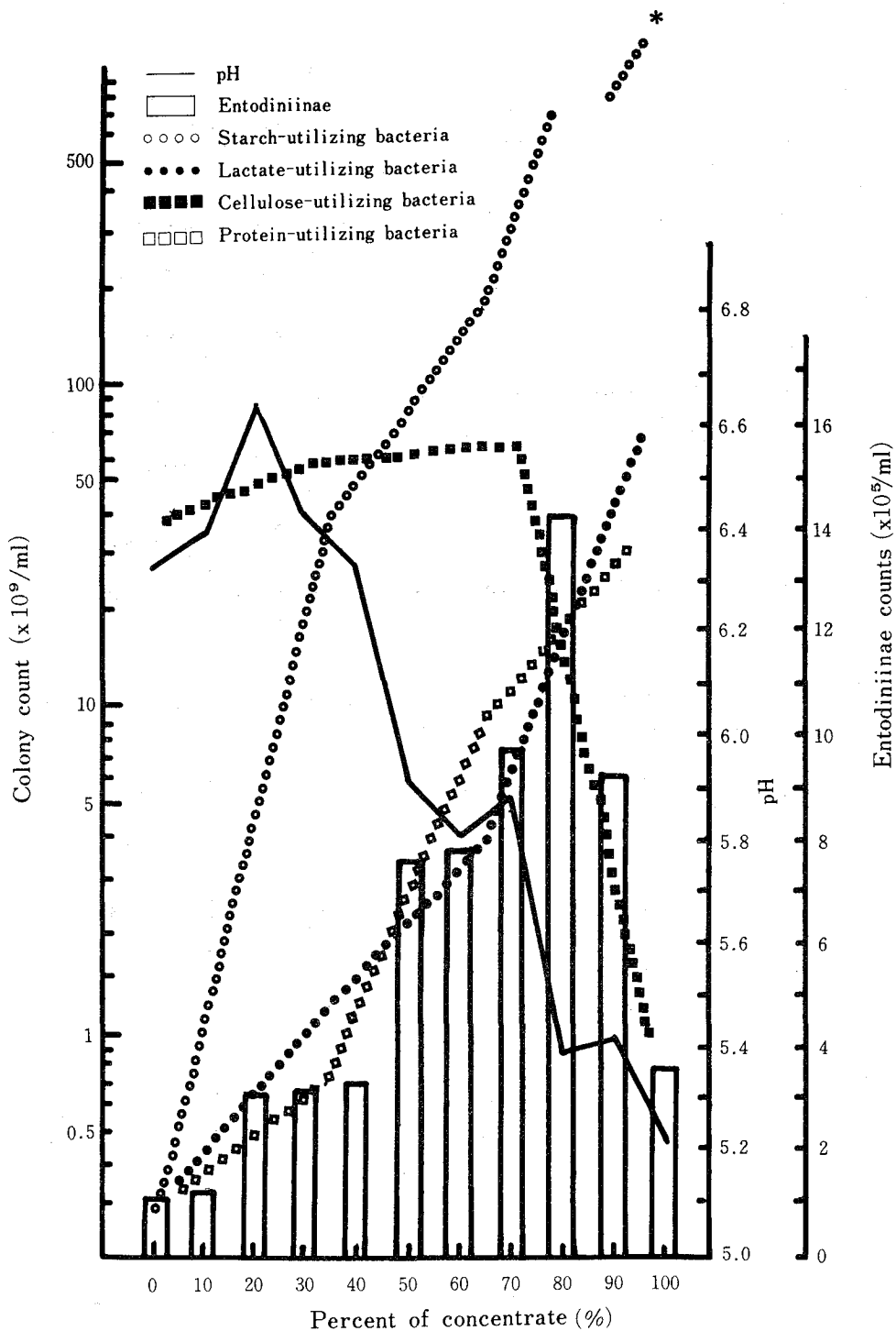


Fig.8. Relationship between ruminal pH and protozoa or bacteria in the rumen liquor from sheep fed increasing concentrate diets. *Uncountable

審査結果の要旨

反すう家畜の栄養生理の特徴は、その第一胃内に生息する微生物の栄養共生関係に負うところが大きい。飼料炭水化物の第一胃内消化に関しても、これまで単離細菌および混合細菌の糖代謝能の面から詳細に研究されてきた。しかし、この点に関する胃内プロトゾアの役割については、あまり研究されていない。本研究は、胃内プロトゾアの主要構成員である *Entodinium* 属繊毛虫のデンプン消化における働きを、その糖代謝能と微生物生態の面から解明したものである。

まず、めん羊の第一胃から *Entodinium simplex* と *E. caudatum* を主構成員とする小型繊毛虫を分離し、これを試験管内で培養する実験により、繊毛虫が小型のデンプン粒を大量に摂食し、これを末端鎖長平均24のアミロペクチン様多糖として蓄積後、徐々に消費することを示した。この結果は、めん羊第一胃内にデンプンを投入した実験によっても確かめられ、デンプンの“ルーメンバイパス”に対する繊毛虫の貢献が示された。

つぎに、飼料の組成と給与条件を変えて、めん羊第一胃内発酵と微生物相の推移を精査した。その結果、デンプン質飼料の給与割合の増加にともない、繊毛虫・細菌は増加し、乳酸が蓄積し始めると繊毛虫とアンモニア濃度が急減するが、細菌はなお増加し続けること、また、繊毛虫数とデンプン利用菌数の間に高い負の相関が存在し、これが繊毛虫のデンプン粒摂食によりよく説明できることが判明した。

また、*Entodinium* 属繊毛虫の糖代謝能に関して酵素化学的検討を加え、この単細胞動物が高等動物と同様に、デンプン分解系、グリコーゲン合成系、解糖系の諸酵素を含み、複雑な糖代謝調節機構をもつことを示した。

このように、本論文は第一胃内炭水化物代謝における繊毛虫の役割について、多くの新知見を加え、反すう家畜栄養におけるその意義を明らかにしたものである。よって、著者は農学博士の学位を授与するに値すると判断した。